Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 15, No.3, Fall 2023, p. 463-473

Identification of Selective Signatures Associated with Resistance to Johne's Disease (JD) in Goat Breeds

Hossein Mohammadi[1*], Mohammad Shamsollahi[2]

Received: 10-01-2023
Revised: 22-02-2023
Accepted: 11-03-2023
Available Online: 11-03-2023

How to cite this article:
Mohammadi, H., & Shamsollahi, M. (2023). Identification of selective signatures associated with resistance to Johne's disease (JD) in goat breeds. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(3), 463-473.
DOI: 10.22067/ijasr.2023.80444.1120

Introduction: Paratuberculosis, or Johne's disease, is a chronic, granulomatous, gastrointestinal tract disease of goat and other ruminants caused by the bacterium Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP). The clinical signs of disease in goat are pipestream diarrhea, weight loss, and edema due to hypoproteinemia caused by protein-losing enteropathy. Knowledge concerning genetics of susceptibility to MAP infection can contribute to disease control programs by facilitating genetic selection for a less susceptible population to reduce incidence of infection in the future. The opportunity for genetic improvement in susceptibility to infection is evidenced by estimates of heritability of MAP infection ranging from 0.03 to 0.28 (Kirkpatrick and Lett, 2018). Domestication and selection has significantly changed the behavioral and phenotypic traits in modern domestic animals. The selection of animals by humans left detectable signatures on the genome of modern goat. The identification of these signals can help us to improve the genetic characteristics of economically important traits in goat. Over the last decade, interest in detection of genes or genomic regions that are targeted by selection has been growing. Identifying signatures of selection can provide valuable insights about the genes or genomic regions that are or have been under selection pressure, which in turn leads to a better understanding of genotype-phenotype relationships. The aim of this study was to identify the selection signatures using the unbiased Theta method associated with resistance to Johne's disease in two Italian goat breeds.

Materials and Methods: The work described here is a case–control association study using the Illumina Caprine SNP50 BeadChip to unravel the genes involved in susceptibility of goats to Johne's disease. Goats in herds with a high occurrence of Johne's disease were classified as healthy or infected based on the level of serum antibodies against MAP, and 331 animals were selected for the study. For the Siriana breed 174 samples (87 cases and 87 controls) were selected from 14 herds and for the Jonica breed 157 samples (77 cases and 80 controls) were selected from 10 herds. Cases were defined as animals serologically positive for MAP by ELISA with a sample to positive ratio (S/P) higher than 0.7 and MAP negative animals had a S/P lower than 0.6. Positive animals were tested twice with the ID Screen Paratuberculosis confirmation test. The 331 samples were genotyped using the Illumina GoatSNP50 BeadChip. SNP missing 5% of data, with MAF of <1% and Hardy–Weinberg equilibrium p-values $<10^{-6}$ were removed. The genotyping efficiency for samples was also verified, and samples with more than 5% missing data were removed. Grouping was done to infer selection signatures based on F_{ST} statistic. Bioinformatics inquiries were conducted employing the Ensembl database (Cunningham et al., 2022), specifically for caprine genes (assembly ARS1). The aim was to pinpoint potential candidate genes that have either been previously reported in, or are situated within the genomic regions encompassing the peak of absolute extreme FST values. In this context, regions corresponding to the top and bottom 0.01% of acquired positive and negative FST scores were earmarked as areas undergoing selection. The identification of genes was executed through the application of a 250 Kb window both upstream and downstream of each core SNP.

Results and Discussion: By applying a threshold at the 99.90 percentile of the obtained Theta (θ) values, a

1- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam. Ilam, Iran.
*Corresponding Author's Email: mohammadi64@araku.ac.ir

total of 13 distinct genomic regions were identified in the Jonica breed. These regions were situated across chromosomes 1, 5, 7 (in 2 regions), 8, 9 (in 2 regions), 11, 16, 17, 18, and 20 (in 2 regions). Similarly, in the Siriana breed, genomic regions were pinpointed on chromosomes 3, 5 (in 2 regions), 10, 12, 16, 17, 18, 23, 24, and 29. Further exploration through bioinformatics tools brought to light the overlap of these genomic regions with genes associated with the immune system, disease resistance, bacterial infection resilience, response to oxidative stress, and tumor suppression. The study population size is relatively modest, predominantly due to the intricacy of procuring a substantial volume of blood samples from goats within commercial herds that have been diagnosed with JD and are poised for culling. It's worth noting that JD diagnosis and culling procedures are not infallible preventive measures. The gradual progression of the disease often leads to late-stage diagnosis, allowing subclinical goats to intermittently excrete MAP in the environment. As the infection and disease progress, the fecal shedding of MAP increases and contributes to its horizontal transmission. In combination with genetic improvement (innate protection), vaccination (acquired protection) will support eradicating this incurable disease.

Conclusions: To conclude, the findings of this study hold potential significance as they offer valuable insights for identifying genomic regions and subsequently, the genes that influence Johne's disease in goats. Nonetheless, additional research endeavors are essential to enhance and validate these outcomes. Utilizing a more extensive sample size, incorporating whole-genome sequencing, and implementing high-density genotyping are imperative steps to further refine and strengthen these findings.

Keywords: Immune system, Johne’s disease, Theta statistic, Signal selection

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۵، شماره ۲، پاییز ۱۴۰۲، ص. ۴۷۳-۴۶۳

شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با مقاومت به بیماری یون (JD) در نژادهای بز

حسین محمّدی[۱]*، محمد شمس‌اللهی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

چکیده

پاراتوبرکلوزیس یا بیماری یون (JD) یکی از بیماری‌های مهم مزمن التهاب روده‌ای در نشخوارکنندگان است. هدف پژوهش حاضر، شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره نااُریب تتا مرتبط با مقاومت به بیماری یون در دو نژاد بز جانیکا و سیریانا می‌باشد. به این منظور، مجموع ۳۳۱ حیوان برای ۵۳۳۴۵ جایگاه نشانگری SNP با استفاده از تراشه‌های Caprine SNP50 BeadChip تعیین ژنوتیپ شدند. پس از کنترل کیفیت داده‌های اولیه در نهایت، ۵۱۱۸۲ نشانگر SNP و ۳۲۶ رأس دام وارد آنالیزهای بعدی شدند. حیوانات مورد استفاده بر اساس آزمون آنتی‌بادی سرم خون (الایزا) در دو دسته مقاوم به بیماری یا سالم (۱۶۲) و بیمار (۱۶۴) گروه‌بندی شدند. با در نظر گرفتن صدک ۹۹/۹ کل ارزش‌های تتا، سیزده ناحیه ژنومی در نژاد جانیکا روی کروموزوم‌های ۱، ۵، ۷ (دو منطقه)، ۸، ۹ (دو منطقه)، ۱۱، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۲۰ (دو منطقه) شناسایی شدند. همچنین، در نژاد سیریانا نواحی ژنومی روی کروموزوم‌های ۳، ۵ (دو منطقه)، ۱۰، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۳، ۲۴ و ۲۹ بالاتر از این دامنه بودند، شناسایی شدند. بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق نشان داد که در داخل یا مجاورت این نواحی، ژن‌های *IL4*، *IL13*، *TLR2*، *TLR4*، *IFNGR1*، *PGLYRP1*، *CHI3L2*، *PPFIBP1* و *DENND5B* قرار داشتند. بررسی بیوانفورماتیکی این مناطق نشان داد، ژن‌های موجود در این مناطق با سیستم ایمنی، مقاومت به بیماری و عفونت باکتریایی، پاسخ به استرس اکسیداتیو و سرکوب سرطان مرتبط هستند. نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی ارزشمندی در زمینه شناسایی مناطق ژنومی و در نتیجه، ژن‌های مرتبط با بیماری یون در نژادهای مختلف بز فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: آماره تتا، بیماری یون، سیستم ایمنی، سیگنال‌های انتخاب

مقدمه

پاراتوبرکلوزیس یا بیماری یون (Johne's disease) از بیماری‌های مسری و از عفونت‌های مزمن روده باریک می‌باشد که عامل اصلی آن *مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه پاراتوبرکلوزیس در نشخوارکنندگان می‌باشد (Sweeney *et al.*, 2012). این بیماری از جنبه شیوع از گسترده‌ترین و از لحاظ اهمیت اقتصادی از مهم‌ترین بیماری‌ها در صنعت دامپروری محسوب می‌شود. علائم این بیماری شامل اسهال شدید، کم خونی، لاغری مفرط و در نهایت، منجر به مرگ دام می‌شود. کاهش تولید، افزایش حساسیت به سایر بیماری‌ها و حذف پیش از موعد دام از پیامدهای اقتصادی این بیماری است. یکی از جنبه‌های مورد توجه در مورد بیماری یون، ارتباط آن با بیماری کرون (Crohn's disease) است که یک بیماری مزمن و مشابه بیماری یون در انسان می‌باشد (Kuenstner *et al.*, 2017).

طی دهه‌های اخیر تمایل به شناسایی ژن‌ها و نواحی ژنومی که هدف انتخاب بوده‌اند، رو به افزایش بوده است. شناسایی نشانه‌های انتخاب می‌تواند دیدگاه‌های ارزشمندی در مورد ژن‌ها و یا مناطق ژنومی که تحت فشار انتخاب بوده و یا هستند، فراهم کند که به نوبه خود منجر به درک بهتر ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ می‌شود. چنانچه یک جهش جدید باعث افزایش شایستگی افراد حامل آن نسبت به سایر افراد جامعه شود، انتخاب باعث می‌شود، افرادی که دارای شایستگی بیشتری هستند در تشکیل نسل بعد مشارکت بیشتری داشته باشند (Khaltabadi Farahani *et al*, 2020). بدین ترتیب فراوانی واریانت جهش یافته، بسته به سهم آن در افزایش شایستگی به‌سرعت شروع به افزایش خواهد کرد (Asadollahpour Nanaei *et al.*,

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران.
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: mohammadi64@araku.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.2023.80444.1120

2022). به عبارت دیگر، هنگامی که انتخاب مثبت به‌سمت افـزایش فراوانی آلل مطلوب پیش می‌رود، جایگاه‌های نزدیک به ایـن جایگـاه اگر هم اثرشان خنثی باشد به‌علت پیوسته بودن با آلل مطلوب، تحـت تأثیر قرار می‌گیرد که در نتیجه این پدیده، الگوی تنوع ژنتیکی و عدم تعادل لینکاژی (LD) در جایگاه‌های اطراف این جهش انتخابی تغییـر خواهد کرد، به‌طوری‌که هر چه به این آلل جدید نزدیـک مـی‌شـویم، میزان تنوع ژنتیکی کاهش و LD افزایش پیدا می‌کند. به این الگوهـا نشـانه‌هـای انتخـاب (Selection Signatures) یـا ردپـای انتخـاب (Selection footprints) گفته می‌شود (Rostamzadeh Mahdabi *et al.*, 2021). یکی از مهم‌ترین آزمون‌های آماری شناسایی نشـانه-های انتخاب، آماره تمایز جمعیتی یا شاخص تثبیـت (F_{ST}) مـی‌باشـد. یکی از مشکلات اصلی روش این می‌باشد که خطای نمونـه‌گیـری را در نظر نمی‌گیرد که این مورد با استفاده از روش ناااریب تتـا (Theta, θ) تصحیح شده است. در پژوهشـی بـا هـدف شناسایی نشـانه‌هـای انتخاب مرتبط با مقاومت به تنش حرارتی و پاسخ سیسـتم ایمنـی در نژادهای مرغ بومی ایران با استفاده از آماره F_{ST} انجام شده بود. نتایج این تحقیق نشان داد، نواحی ژنومی روی کروموزوم‌هـای ۱، ۳، ۵، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۳ دارای نشانه‌های انتخاب هستند. این مناطق ژنومی شامل ژن‌هـای کاندیـدای *HSP70*، *HSPA9*، *HSP90AB1* و *PLCB4* بودند که نقش کلیدی در آداپتاسیون، سیستم ایمنـی و مقاومـت بـه تنش حرارتی دارند (Asadollahpour Nanaei *et al.*, 2022).

طی پژوهشی روی گاوهای هلشتاین با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از آماره F_{ST} مرتبط با بیماری لکـوز گـاوی (BLV) انجام شده بود. نتایج این تحقیق چهار منطقه ژنومی روی کروموزوم-های ۱، ۱۳، ۲۰ و ۲۲ گزارش کردند که ژن‌های کاندیدای موجـود در این مناطق با سیستم ایمنی و سرکوب سرطان مرتبط بودنـد (Javan Nikkhah, 2019). همچنین مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسـایی مناطق ژنومی مرتبط با صفات تولیدی و بیماری بـا اسـتفاده از آمـاره F_{ST} در نژادهای مختلف گاو شیری انجام شـده اسـت کـه منجـر بـه شناسایی مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۳، ۶، ۷، ۹ و ۲۷ شده بود که حاوی ژن‌های کاندیدای *DEFB4*، *DEFB7* و *DEFB10* مرتبط با بیماری ورم پستان بودند (Saravanan *et al.*, 2021).

شناسایی مناطق ژنومی در نژاد گاو نلور و بررسی تمایز جمعیتی با اسـتفاده از آمـاره F_{ST} نشـان داد کـه چنـدین منطقـه ژنـومی روی کرومـوزوم‌هـای ۱، ۳، ۴، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۸ و ۲۳ دارای شـواهدی از انتخاب می‌باشند. بررسی مناطق کاندیدا نیز حاکی از آن بود کـه ژن-های موجـود در ایـن منـاطق بـا صـفات مهـم اقتصـادی مـرتبط بـا آداپتاسیون به آب و هوای گرم و خشک، رشد و انـدازه بـدن و بـازده خوراک هم‌پوشانی دارند (Maiorano *et al.*, 2022).

به‌طور کلی، مناطقی از ژنوم که تحت انتخـاب هسـتند، بایسـتی اهمیت شایستگی و عملکـردی داشـته باشـند، در غیـر ایـن صـورت، انتخاب آن‌ها را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد. با توجه به مطالب بیان شده، این مناطق ژنومی عمدتاً با ژن‌های عمده اثر و صفات مهم اقتصـادی همراه هستند و دارای اهمیت زیادی مـی‌باشـند (Azizpour *et al.*, 2020). از طرف دیگر، با توجه به اهمیت صفات سلامت و آسیب‌های ناشی از بیماری‌ها در صنعت دام سبک، هدف از این تحقیـق، کـاوش ژنومی نشانه‌هـای انتخـاب و شناسـایی نـواحی کاندیـدای مـرتبط بـا بیماری یون (JD) در سطح ژنوم نژادهای مختلف بز بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، از اطلاعات ژنوتیپی مجموع ۳۳۱ رأس بزهای غیر خویشاوند مربوط به ۱۵۷ نمونه نژاد جانیکـا (۷۷ رأس مقـاوم بـه بیماری یا سالم و ۸۰ رأس بیمار) و ۱۷۴ نمونه بزهای نژاد سیریانا (۸۷ رأس مقـاوم بـه بیمـاری یـا سـالم و ۸۷ رأس بیمـار) اسـتفاده شـد (Minozzi *et al.*, 2023). لازم به ذکر است که مـدیریت اسـتخراج DNA و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها نیز توسط دانشگاه میلان کشور ایتالیا انجام شد. پس از اطمینان از کمیت و کیفیت بالای DNA اسـتخراج شده، نمونه‌ها با استفاده از آرایه‌هـای شـرکت ایلومینـا بـا آرایـه‌هـای Caprine SNP50 BeadChip تعیین ژنوتیپ شدند. داده‌های مـورد استفاده در ایـن پـژوهش در پایگـاه بـرخط ذخیـره داده‌هـای ژنـومی ownCloud با شماره دسترسی (u8yfoXKCaIPxelQ) در دسترس می‌باشد.

جهت اطمینان از کیفیت داده‌هـای حاصـل از تعیـین ژنوتیـپ در تجزیه نهایی، ویرایش داده‌هـا و مراحـل مختلـف کنتـرل کیفیـت بـا استفاده نرم‌افزار PLINK (نسخه ۱/۹) (Purcell *et al.*, 2007) روی داده‌های اولیه تعیین ژنوتیپ شده انجام شد. در نخستین مرحلـه، دام-هایی با بیش از پنج درصد ژنوتیپ از دست رفتـه از آنالیزهـای بعـدی حذف شدند. سپس از دو عامل فراوانی آللی نادر (MAF) و نرخ تعیین ژنوتیپ (Call rate) برای هر نشانگر SNP محاسـبه شـده و SNP-هایی که در مجموع دام‌ها دارای MAF و Call rate به‌ترتیـب کمتـر از یک درصد و ۹۵ درصد بودند، از مراحل بعدی آنالیزها کنار گذاشـته شدند. سپس نشانگرهای باقی‌مانده که بـه‌شـدت از تعـادل هـاردی-واینبرگ انحراف داشتند (p-values$<10^{-6}$) به‌عنوان معیار دیگـری از خطای تعیین ژنوتیپ از آنالیز نهایی کنار گذاشته شدند.

آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) پـس از گذرانـدن مراحـل کنتـرل کیفیت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار PLINK V1.9 محاسبه و گـراف PCA توسط نرم‌افزار برنامه R نسخه ۴/۲ ترسـیم شـد تـا عـلاوه‌بـر تفکیک نژادها، دام‌هایی که خارج از توده نژادی خود قرار دارند، بـرای حذف شناسایی شوند.

آنالیز آماری شناسایی نشانه‌های انتخاب

در این پژوهش، برای شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با مقاومت به بیماری یون ابتدا حیوانات براساس ابتلا به این بیماری به دو گروه مقاوم به بیماری یا سالم (موردی) و بیمار (شاهد) دسته‌بندی شدند. برای شناسایی و دسته‌بندی دام‌های مورد بررسی در این پژوهش از آزمایش آنتی‌بادی سرم خون (الآیزا) دام‌ها استفاده شده و دام‌های سرم مثبت، بیمار (شاهد) و دام‌های سرم منفی، مقاوم به بیماری یا سالم (موردی) دسته‌بندی شدند. سپس برای شناسایی نواحی تحت انتخاب از آزمون تمایز جمعیتی F_{ST} استفاده شد. آزمون تمایز جمعیتی F_{ST} به دو روش رایت (Wright, 1965) و روش برآوردگر ناااریب تتا (θ) (Weir and Cockerham, 1984) محاسبه می‌شود. یکی از مشکلات اصلی روش رایت، عدم در نظر گرفتن خطای نمونه‌گیری است که این مشکل توسط ویر و کوکرهام (Weir and Cockerham, 1984) با ارائه روش تتا تصحیح شد که مستقل از شمار گروه‌های نمونه‌گیری شده و شمار افراد داخل هر گروه است. ارزش‌های بدست آمده از این روش‌ها بین صفر تا یک متغیر است. محاسبه‌های مربوط به دو روش رایت و تتا در محیط R برنامه‌نویسی شد. جهت شناسایی بهتر سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم به‌جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP از میانگین‌گیری ارزش‌های عددی SNPهای مجاور به‌روش Creeping Window (CW) با طول ۵۰۰ کیلو جفت باز استفاده شد (Kim *et al*., 2015) و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند (Saravanan *et al*., 2021Kijas *et al*., 2012 ;). در این تحقیق، برای ترسیم گراف ارزش‌های Win10 در مقابل موقعیت ژنومی از بسته نرم‌افزاری ggplot در برنامه R استفاده گردید.

بررسی ژن‌های گزارش شده در مناطق ژنومی حاوی نشانه‌های انتخاب

پس از مرتب کردن نشانگرها بر پایه ارزش محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار Excel صدک ۹۹/۹ محاسبه و مناطقی که برای همه نشانگرهای مجاور ارزش بالایی داشتند، به‌عنوان نشانه انتخاب در نظر گرفته شدند. مناطق دارای ارزش بالای تتا می‌توانند نشان-دهنده مناطقی از ژنوم باشند که در گروه‌های سالم (موردی) و بیمار (شاهد) به‌صورت متمایز هدف انتخاب قرار گرفته باشند. برای بررسی ژن‌های گزارش شده در این مناطق و ۲۵۰ کیلو جفت‌باز اطراف آن‌ها از پایگاه اطلاعاتی برخط Ensembl Genes 108 Database به‌وسیله BioMart (www.ensembl.org/biomart) مورد بررسی قرار گرفت. برای تفسیر بهتر عملکرد ژن‌های بدست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی آنلاین GeneCards (http://www.genecards.org) و UniProtKB (http://www.uniprot.org) استفاده شد.

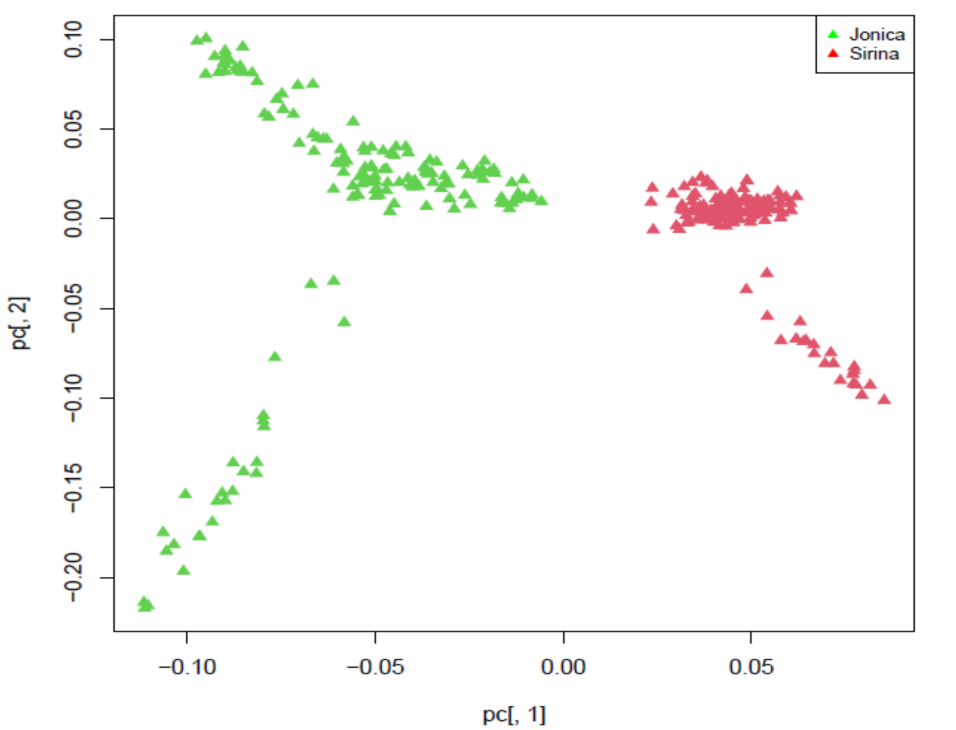
نتایج و بحث

مراحل مختلف کنترل کیفیت روی مجموع ۵۳۳۴۵ نشانگر SNP در ۱۵۷ رأس بز نژاد بز جانیکا (۷۷ رأس مقاوم به بیماری یا سالم و ۸۰ رأس بیمار) انجام شد. ابتدا تعداد پنج رأس بز به‌علت درصد SNP تعیین ژنوتیپ شده کمتر از ۹۵ درصد حذف شدند. از بین SNPهای اولیه نیز تعداد ۱۱۳۵ و ۹۶۱ نشانگر به‌دلیل پایین بودن به‌ترتیب فراوانی آللی نادر و نرخ تعیین ژنوتیپ حذف شدند. در نهایت، تعداد ۶۷ نشانگر SNP به‌خاطر انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ از مراحل بعدی کنار گذاشته شدند. در پایان، پس از اجرای مراحل کنترل کیفیت داده‌ها، ۵۱۱۸۲ نشانگر و ۱۵۲ رأس دام (۷۵ سالم و ۷۷ بیمار) توانستند مراحل مختلف فیلتراسیون داده‌ها را بگذرانند و برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی باقی بمانند.

همچنین در ارتباط با تعداد ۱۷۴ رأس بز نژاد سیریانا (۸۷ رأس مقاوم به بیماری یا سالم و ۸۷ رأس بیمار)، هیچ حیوانی به‌علت درصد SNP تعیین ژنوتیپ شده کمتر از ۹۵ درصد حذف شدند. از بین SNPهای اولیه نیز تعداد ۱۳۶۲ و ۷۲۵ نشانگر به‌دلیل پایین بودن به ترتیب فراوانی آللی نادر و نرخ تعیین ژنوتیپ حذف شدند؛ و در نهایت، تعداد ۷۳ نشانگر SNP به‌خاطر انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ از مراحل بعدی کنار گذاشته شدند. در پایان، پس از اجرای مراحل کنترل کیفیت داده‌ها، ۵۱۱۸۵ نشانگر و ۱۷۴ رأس دام توانستند مراحل مختلف فیلتراسیون داده‌ها را بگذرانند.

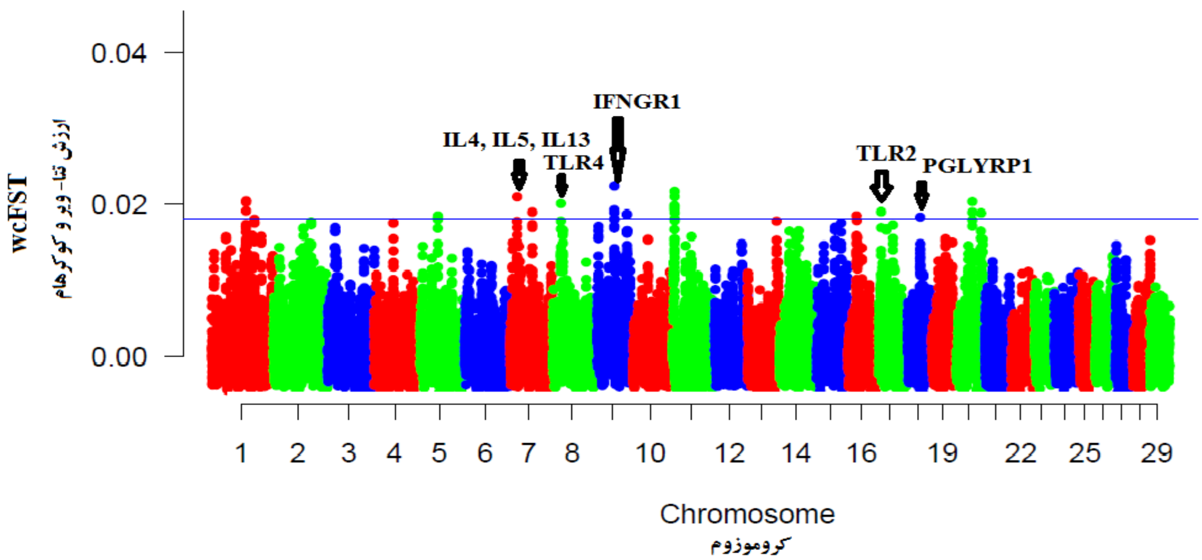
به‌منظور بررسی نحوه قرار گرفتن حیوانات در گروه‌های نژادی، تجزیه و تحلیل PCA با به‌کارگیری اطلاعات تعیین ژنوتیپی بین نژادهای جانیکا و سیریانا به‌عنوان راهی متمایز به‌منظور توصیف واگرایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج آنالیز PCA نشان داد که با PC1 نژاد سیریانا و PC2 نژاد جانیکا به‌خوبی از یکدیگر تفکیک و جدا شدند و در هیچ نقطه‌ای با هم هم‌پوشانی ندارند.

با توجه به اینکه انتخاب، علاوه‌بر جهش سودمند جایگاه‌های مجاور آن را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد (Akey *et al*., 2002)، در این پژوهش جهت شناسایی بهتر سیگنال‌های انتخاب در سطح ژنوم به‌جای در نظر گرفتن ارزش عددی هر SNP، میانگین‌گیری ارزش-های عددی SNPهای مجاور به‌روش CW با طول ۱۰ SNP صورت گرفت و تنها ۰/۱ درصد مناطقی از ژنوم که در آن تمام نشانگرهای مجاور دارای ارزش بالایی باشند، به‌عنوان نشانه‌های انتخاب شناسایی و تعیین شدند (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۱– خوشه‌بندی حیوانات بر اساس آنالیز PCA با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی تمام حیوانات

Figure 1- Animals clustered on the basis of principal components analysis (PCA) using genotyping information animals

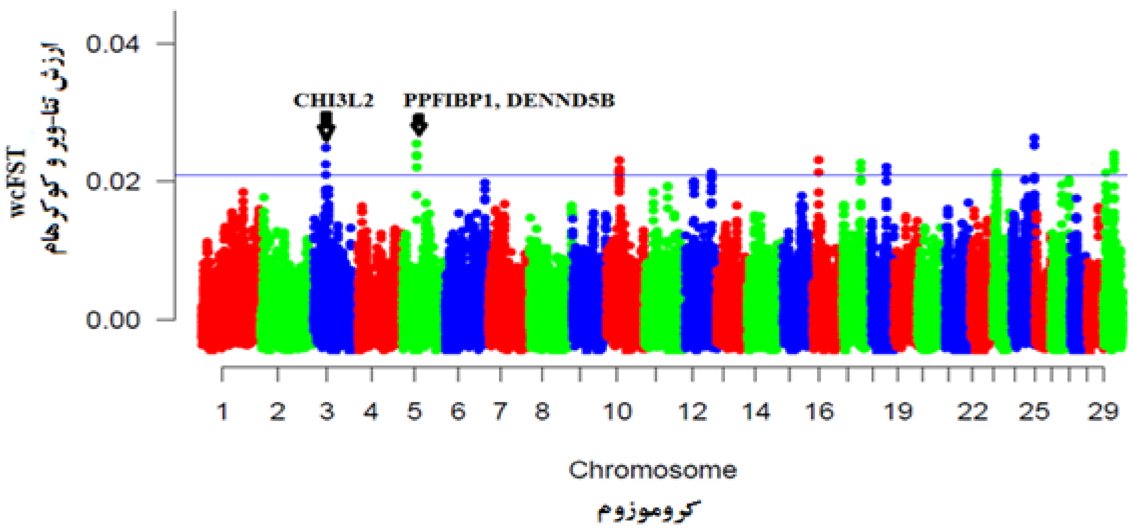


شکل ۲- توزیع ارزش‌های win10 تتا در سطح ژنوم حیوانات سالم و بیمار به بیماری یون در نژاد بز جانیکا

Figure 1- Distribution of 10 windowed theta values for healthy and patient in Jonica breed of Johne’s disease

موقعیت ژنومی SNPها بر روی محور X و ارزش‌های تتای آن‌ها بر روی محور Y نشان داده شده است. خط ترسیم شده نشان‌دهنده ۹۹/۹ صدک کروموزوم‌ها است.

The SNP position on different chromosomes shown on the X-axis, and theta values are plotted on the Y-axis. The values above the line are in the 99.9 percentile of all Theta values.



شکل ۳- توزیع ارزش‌های win10 تتا در سطح ژنوم حیوانات سالم و بیمار به بیماری یون در نژاد بز سیریانا

Figure 1- Distribution of 10 windowed theta values for healthy and patient in Siriana breed of Johne's disease

موقعیت ژنومی SNPها بر روی محور X و ارزش‌های تتای آن‌ها بر روی محور Y نشان داده شده است. خط ترسیم شده نشان‌دهنده ۹۹/۹ صدک کروموزوم‌ها است.

The SNP position on different chromosomes shown on the X-axis, and theta values are plotted on the Y-axis. The values above the line are in the 99.9 percentile of all Theta values.

حد آستانه در نظر گرفته شده سخت‌گیرانه بود و فقط مناطقی که بیشترین تمایز جمعیتی را در این نژادها را نشان می‌دهند و مشابه با مطالعه ژو و همکاران (Zhu *et al.*, 2015) بر روی گوسفندان نژاد مختلف بود. مناطقی‌که دارای ارزش بالای تتا می‌توانند نشان‌دهنده مناطقی از ژنوم باشند که در گروه‌های سالم و بیمار به‌صورت متمایز هدف انتخاب قرار گرفته و می‌توانند به‌عنوان کاندیدا برای این صفت مهم اقتصادی در نژادهای مورد مطالعه باشند.

نتایج به‌دست آمده در نژاد جانیکا نشان داد، ۱۳ ناحیه ژنومی بر روی کروموزوم‌های ۱، ۵، ۷ (دو منطقه)، ۸، ۹ (دو منطقه)، ۱۱، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۲۰ (دو منطقه) تفرق جمعیتی بالایی داشته و دارای ارزش تتای بالاتر ۰/۱ درصد می‌باشند (شکل ۱). همچنین در ارتباط با نژاد سیریانا نتایج به‌دست آمده، حاکی از آن بود که مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۳، ۵، ۱۰، ۱۲، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۲۳، ۲۴ و ۲۹ تفرق جمعیتی بالایی داشته و دارای ارزش تتای بالایی بین دو جمعیت مقاوم به بیماری یا سالم و بیمار قرار داشت (شکل ۲).

از روش نشانه‌های انتخاب و آماره تتا تاکنون جهت شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری‌های مختلف در دام‌های اهلی استفاده شده است. در یک بررسی با هدف شناسایی مناطق ژنومی مرتبط با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین آلمانی از آماره تمایز جمعیتی تتا استفاده کردند. نتایج آن‌ها منجر به شناسایی مناطق ژنومی کاندیدا روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۵، ۶، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ شده بود و بررسی بیوانفورماتیکی این مناطق نشان داد که ژن‌های موجود در این مناطق با سیستم ایمنی، بیماری‌های خود ایمنی، انواع سرطان و سیستم عصبی مرتبط می‌باشند (Abbasi Moshaii, 2018).

پس از شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب، ژن‌های موجود در این مناطق شناسایی و عملکرد بیوشیمیایی آن‌ها بررسی شدند (جداول ۱ و ۲). ژن‌های مشخص شده در جداول ۲-۱ عملکردهای متفاوتی در سیستم ایمنی بدن، مقاومت به عفونت‌های باکتریایی و انگلی بوده که می‌توانند به‌طور مستقیم و غیر مستقیم با صفت مقاومت به بیماری یون مرتبط باشند.

در مجموع، ۷۵ ژن که در ارتباط با منطقه انتخابی بودند، از این طریق تعیین شدند. اطلاعات مربوطه به این ژن‌ها در جداول ۲-۱ آورده شده است. در این بخش، برخی از ژن‌ها که احتمالاً تحت انتخاب مثبت مرتبط با سیستم ایمنی بوده‌اند، مورد بحث و تحلیل قرار می‌گیرند. شماری از ژن‌ها در این بررسی به‌عنوان نشانه‌های انتخاب گزارش شده‌اند، با بررسی‌های پیشین هم‌خوانی داشت.

انتخاب قوی برای عملکرد سامانه ایمنی ممکن است پس از قرار گرفتن حیوانات در معرض عامل‌های بیماری‌زای جدید هنگام تغییر در مدیریت پرورشی برای اهلی شدن و شکل‌گیری نژاد رخ دهد (Ramey *et al.*, 2013). اینترلوکین‌ها جزوی از خانواده سایتوکین‌ها می‌باشند. سایتوکین‌ها (Cytokines) خانواده بزرگی از مولکول‌های قابل حل در آب هستند که نقش تنظیمی در پاسخ به التهاب دارند. سایتوکین‌ها پروتئین‌های محلولی هستند که در تنظیم ایمنی نقش دارند. به‌طوری‌که هم در ایمنی ذاتی و هم در ایمنی اکتسابی نقش

دارند. ژن‌های *IL4*، *IL5* و *IL13* هم جزو گروه سایتوکین‌ها (IL1a, IL1ß, IL4R, IL5, IL7, IL15, IL23A, IFN-c) نقش کلیدی در پاسخ‌های ایمنی دارند (https://www.genecards.org). در مطالعه-ای در گاوهای هلشتاین چینی، ژن *IL5* و *IL23R* در ارتباط با ایمنی ذاتی با بیماری *مایوباکتریوم آویوم* زیر گونه پاراتوبرکلوزیس گزارش شده است (Gao *et al*., 2018).

شناسایی مناطق ژنومی با استفاده از آماره تتا در گوسفند و بز نژاد بارکی بومی مصر با ۴۹۰۰۰ نشانگر SNP با هدف شناسایی نواحی ژنومی تحت انتخاب مثبت به آب و هوای گرم و خشک نشان داد که چندین منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۱، ۳، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۱۹ و ۲۱ دارای شواهدی از انتخاب می‌باشند. بررسی ژن‌های گزارش شده (*IL2*، *IL7*، *IL21* و *IL1R1*) حاکی از آن بود که این مناطق با ژن‌های مرتبط به استرس گرمایی، سیستم عصبی و پاسخ سیستم ایمنی همپوشانی دارند (Kim *et al*., 2015).

جدول ۱- نواحی ژنومی تحت انتخاب و ژن‌های شناسایی شده در این مناطق ژنومی مرتبط با مقاومت به بیماری یون در نژاد جانیکا

Table 1- Genomic regions containing selection signatures in resistant animals with Johne’s disease, and genes reported in these genomic regions in Jonica breed

شماره کروموزوم Number of chromosome	موقعیت ژنومی (جفت باز) Genomic position (bp)	ژن‌های موجود در ناحیه ژنومی Reported genes in the region
1	85422458:85922458	*U6, FXR1*
5	43264473:43764473	*BEST3, LRRC10, CCT2, FRS2*
7	88434373:88934373	*SLC22A4, IRF1, IL5, RAD50, IL13, IL4*
7	54412582:54912582	*KIF3A, KIF4A*
8	106466079:106966079	*TLR4, PEX7, SLC35D3*
9	42736335:43236335	*IL20RA, IL22RA2*
9	61948202:62448202	*IL22RA2, IFNGR1*
11	4221335:4721335	*LIPT1, MITD1, MRPL30, LYG2, LYG1, TXNDC9, EIF5B, REV1*
16	20765529:21265529	*LYPLAL1*
17	66587333:67087333	*MND1, TMEM131L, TLR2, RNF175, SFRP2*
18	54312264:54812264	*QPCTL, FBXO46, DMPK, FOXA3, IRF2BP1, MYPOP, CCDC61, PGLYRP1, IGFL1, PPP5C*
20	38685759:39185759	*PRLR, AGXT2*
20	38757897:39257897	*DNAJC21, BRIX1*

ژن‌های کاندیدای *TLR2* و *TLR4* به‌ترتیب روی کروموزوم‌های ۱۷ و ۸ در نواحی ژنومی ۶۶/۸۳ و ۱۰۶/۷۱ مگابازی گونه بز قرار دارند. TLRها، خانواده‌ای از گیرنده‌های شناسایی الگو هستند که در سیر تکامل، بدون تغییر مانده و حفظ شده‌اند، و در بسیاری از انواع سلول‌ها بیان می‌شوند و نقش اساسی را در پاسخ‌های ایمنی ذاتی بر ضد میکروب‌ها ایفاء می‌کنند (https://www.genecards.org). در مطالعات پویش ژنومی مختلفی ارتباط معنی‌داری بین ژن کاندیدای *TLR2* با مقاومت به تنش حرارتی و سیستم ایمنی در بز گزارش شده است (Abioja *et al*., 2023).

ژن کاندیدای *IFNGR1* روی کروموزوم شماره ۹ در ناحیه ژنومی ۶۲/۱۹ مگا جفت‌بازی گونه بز قرار دارد. ژن *IFNGR1*، نقش مرکزی در پاسخ ایمنی ذاتی به پاتوژن ها را دارد. همچنین در فرآیندهای مسیرهای بیولوژیکی در تولید سایتوکین‌ها دارد. ژن *IFNGR1* در مطالعه چن و همکاران (Chen *et al*., 2020) با هدف شناسایی سیگنال‌های انتخاب بر روی بزهای نژاد Du’an Goat را گزارش کردند.

ژن کاندیدای *PGLYRP1* در ناحیه بین ۵۴/۵۶۲ و ۵۴/۵۶۶ مگا جفت باز روی کروموزوم ۱۸ بز قرار گرفته است. ژن *PGLYRP1* نقش تنظیمی فعال‌کننده T-cell می‌باشد. گیرنده‌های لنفوسیت‌های سلول‌های T می‌باشد که در پاسخ ایمنی ذاتی نقش دارند. وجود سلول‌های T برای واکنش ایمنی ضروری است و بدون آن‌ها، بدن نمی‌تواند با عفونت‌ها مقابله کند. ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن *PGLYRP1* با شمارش سلول‌های سوماتیک در گاوهای شیری هلشتاین گزارش شده است (Wang *et al*., 2013). همچنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی در ژن *PGLYRP1* با انواع سرطان در انسان گزارش شده است (Cui *et al*., 2022).

جدول ۲- نواحی ژنومی تحت انتخاب و ژن‌های شناسایی شده در این مناطق ژنومی مرتبط با مقاومت به بیماری یون در نژاد سیریانا

Table 2- Genomic regions containing selection signatures in resistant animals with Johne's disease, and genes reported in these genomic regions in Siriana breed

شماره کروموزوم Number of chromosome	موقعیت ژنومی (جفت باز) Genomic position (bp)	ژن‌های موجود در ناحیه ژنومی Reported genes in the region
3	88164235:88664235	*LRIF1, DRAM2, CEPT1, DENND2D, CHI3L2, CHIA*
5	80466907:80966907	*AMN1, DENND5B, KLHL42*
5	76769745:77269745	*REP15, PPFIBP1, SMCO2*
10	31739033:32239033	-
12	67882523:68382523	*RCBTB2, RB1, LPAR6*
16	13346634:13846634	-
17	44288137:44788137	-
18	39462315:39962315	*ZFHX3, U6*
23	9537704:10037704	*ATXN1*
24	58027182:58527182	*MALT1, ZNF532, GRP, RAX, CPLX4, LMAN1*
19	25815212:26315212	*SAA4, OR8D4, OR4D5, OR6T1, OR10S1, OR10G6*

ژن‌های *CHI3L2* و*PPFIBP1* به‌ترتیب روی کروموزوم‌های ۳ و ۵ در نواحی ژنومی ۸۸/۴۱ و ۸۰/۷۱ قرار داشتند. در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی مناطق ژنومی تحت انتخاب مثبت در پنج نژاد گاوهای سوئدی، ژن کاندیدای *PPFIBP1* مرتبط با مقاومت به عفونت‌های باکتریایی گزارش شده است (Ghoreishifar *et al.*, 2020). همچنین در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب مرتبط با مقاومت به بیماری‌های انگلی معده-روده‌ای در گوسفند، ژن کاندیدای *CHI3L2* گزارش شده است (McRae *et al.*, 2014).

همچنین ژن کاندیدای *DENND5B* روی کروموزوم ۵ و در ناحیه ژنومی ۷۷/۰۱ مگابازی گونه بز قرار دارد. در مطالعه پویش ژنومی با هدف شناسایی نشانه‌های انتخاب در گاوهای گوشتی نژاد Canchim، ژن کاندیدای *DENND5B* گزارش شد که در مقاومت به بیماری‌های انگلی و سیستم عصبی نقش کلیدی دارد (Duarte *et al.*, 2022).

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه، برای شناسایی نشانه‌های انتخاب از آماره تمایز جمعیتی تتا استفاده شد و نشانه‌های انتخاب در بخش‌هایی از ژنوم شناسایی شد که برخی از این مناطق در بررسی‌های پیشین در انسان و دام‌های اهلی دیگر نیز تأیید شده بودند. بررسی ژن‌ها در نواحی تحت انتخاب نشان داد، ژن‌های موجود در این مناطق با سیستم ایمنی، مقاومت به بیماری و عفونت باکتریایی، پاسخ به استرس اکسیداتیو و سرکوب سرطان مرتبط هستند. در مجموع، نتایج این تحقیق می‌تواند منبع اطلاعاتی با ارزشی در جهت شناسایی ژن‌های مهارکننده بیماری یون ارائه دهد و آغازی برای بررسی‌های بیشتر در این زمینه و استفاده از اطلاعات به‌دست آمده در شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی این بیماری مهم اقتصادی در صنعت پروش بز باشد.

References

1. Abbasi Moshaii, B. (2018). Genomic scan for selection signatures and identification of some candidate regions associated with mastitis in German Holstein cattle. Ph.D. Thesis of Animal Breeding and Genetics, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. 128.
2. Abioja, M. O., Logunleko, M. O., Majekodunmi, B. C., Adekunle, E. O., Shittu, O. O., Odeyemi, A. J., Nwosu, E. U., Oke, O. E., Iyasere, O. S., Abiona, J. A., & Williams, T. J. (2022). Roles of candidate genes in the adaptation of goats to heat stress: A review. *Small Ruminant Research*, *2*,106878. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106878.
3. Akey, J. M., Zhang, G., Zhang, K., Jin, L., & Shriver, M. D. (2002). Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, *12*(12), 1805-1814. doi: 10.1101/gr.631202
4. Asadollahpour Nanaei, H., Kharrati-Koopaee, H., & Esmailizadeh, A. (2022). Genetic diversity and signatures of selection for heat tolerance and immune response in Iranian native chickens. *BMC Genomics*, *23*(1),224. doi: 10.1186/s12864-022-08434-7.
5. Azizpour, N., Khelatabadi, A., Moradi, M., Mohammadi, H. (2020). Genome-wide association study based on gene-set enrichment analysis associated with milk yield in Holstein cattle. *Journal of Animal Science Research*, 30(1), 79-92. (In Persian). doi: 10.22034/as.2020.11009.

6. Chen, Q., Wang, Z., Sun, J., Huang, Y., Hanif, Q., Liao, Y., & Lei, C. (2020). Identification of genomic characteristics and selective signals in a Du'an Goat Flock. *Animals (Basel), 10*(6),994. doi: 10.3390/ani10060994.
7. Cui, X., Chang, Z., Dang, T., Meng, J., Wang, P., Wu, J., & Chai, J. (2022). TNF upregulates peptidoglycan recognition protein 1 in esophageal cancer cells to clear the path to its signaling: Making the "enemy" a friend. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 722*,109192. doi: 10.1016/j.abb.2022.109192.
8. Duarte, I. N. H., Bessa, A. F. O., Rola, L. D., Genuíno, M. V. H., Rocha, I. M., Marcondes, C. R., Regitano, L. C. A., Munari, D. P., Berry, D. P., & Buzanskas, M. E. (2022). Cross-population selection signatures in Canchim composite beef cattle. *PLoS One, 17*(4),e0264279. doi: 10.1371/journal.pone.0264279.
9. Gao, Y., Jiang, J., Yang, S., Cao, J., Han, B., Wang, Y., Zhang, Y., Yu, Y., Zhang, S., & Zhang Q. (2018). Genome-wide association study of *Mycobacterium avium* subspecies Paratuberculosis infection in Chinese Holstein. *BMC Genomics, 19*(1),972. doi: 10.1186/s12864-018-5385-3.
10. Ghoreishifar, S. M., Eriksson, S., Johansson, A. M., Khansefid, M., Moghaddaszadeh-Ahrabi, S., Parna, N., Davoudi, P., & Javanmard, A. (2020). Signatures of selection reveal candidate genes involved in economic traits and cold acclimation in five Swedish cattle breeds. *Genetic Selection Evolution*, 52(1),52. doi: 10.1186/s12711-020-00571-5.
11. Javan Nikkhah, M. (2019). Identification of selective signatures associated with resistance to bovine leukosis (BLV) in Iranian Holstein cows. Ph.D. Thesis of Animal Breeding and Genetics, Tehran University, Iran. 139.
12. Khaltabadi Farahani, A. H., mohammadi, H., & moradi, H. (2020). Gene set enrichment analysis using genome-wide association study to identify genes and pathways associated with litter size in various sheep breeds. *Animal Production*, 22(3), 325-335. (In Persian). doi: 10.22059/jap.2020.292715.623468.
13. Kim, H., Song, K. D., Kim, H. J., Park, W., Kim, J., & Lee, T. (2015). Exploring the genetic signature of body size in Yucatan miniature pig. *PLoS one, 10*,4e0121732. doi: 10.1371/journal.pone.0121732.
14. Kuenstner, J. T., Naser, S., Chamberlin, W., Borody, T., Graham, D. Y., McNees, A., Hermon-Taylor, J., Hermon-Taylor, A., Dow, C. T., & Kuenstner, L. (2017). The Consensus from the *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis (MAP) Conference. *Frontiers Public Health, 5*,208. doi: 10.3389/fpubh.2017.00208.
15. Kijas, J. W., Lenstra, J. A., Hayes, B., Boitard, S., Porto Neto, L. R., San Cristobal, M., Servin, B., McCulloch, R., Whan, V., McEwan, J., & Dalrymple, B. (2012). International sheep genomics consortium members. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biological, 10*(2),e1001258. doi: 10.1371/journal.pbio.1001258.
16. McRae, K. M., McEwan, J. C., Dodds, K. G., & Gemmell, N. J. (2014). Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes. *BMC Genomics, 15*(1),637. doi: 10.1186/1471-2164-15-637.
17. Maiorano, A. M., Cardoso, D. F., Carvalheiro, R., Júnior, G. A. F., de Albuquerque, L. G., & de Oliveira, H. N. (2022). Signatures of selection in Nelore cattle revealed by whole-genome sequencing data. *Genomics, 114*(2),110304. doi: 10.1016/j.ygeno.2022.110304.
18. Minozzi, G., De Iorio, M. G., Palazzo, F., Gandini, G., Biffani, S., Paolillo, G., Ciani, E., Di Marco Lo Presti, V., Stella, A., & Williams, J. L. (2023). Genome-wide association study for antibody response to *Mycobacterium avium* ssp. paratubeculosis in goats. *Animal Genetics*, *54*(1),78-81. doi: 10.1111/age.13271.
19. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics, 81*(3),559-75. doi: 10.1086/519795.
20. Ramey, H., Decker, J., McKay, S., Rolf, M., Schnabel, R., & Taylor, J. (2013). Detection of selective sweeps in cattle using genome-wide SNP data. *BMC Genomics*, *14*,382. doi: 10.1186/1471-2164-14-382.
21. Rostamzadeh Mahdabi, E., Esmailizadeh, A., Ayatollahi Mehrgardi, A., & Asadi Fozi, M. (2021). A genome-wide scan to identify signatures of selection in two Iranian indigenous chicken ecotypes. *Genetic Selection Evolution, 53*(1),72. doi: 10.1186/s12711-021-00664-9.
22. Saravanan, K. A., Panigrahi, M., Kumar, H., Parida, S., Bhushan, B., Gaur, G. K., Dutt, T., Mishra, B. P., & Singh, R. K. (2021). Genomic scans for selection signatures revealed candidate genes for adaptation and production traits in a variety of cattle breeds. *Genomics*, *113*(3),955-963. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.02.009.
23. Sweeney, R. W., Collins, M. T., Koets, A. P., McGuirk, S. M., & Roussel, A. J. (2012). Paratuberculosis (Johne's disease) in cattle and other susceptible species. *Journal of Veterinary International Medicine*, (6),1239-50. doi: 10.1111/j.1939-1676.2012.01019.x.
24. Wang, H. L., Li, Z. X., Wang, L. J., He, H., Yang, J., Chen, L., & Liu, X. L. (2013). Polymorphism in PGLYRP-1 gene by PCR-RFLP and its association with somatic cell score in Chinese Holstein. *Research Veterinary Science, 95*(2),508-14. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.06.005.
25. Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution, 38*(6),1358-1370. doi: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x
26. Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution, 1*,395-420.

27. Zhu, C., Fan, H., Yuan, Z., Hu, S., Zhang, L., Wei, C., Zhang, Q., Zhao, F., & Du, L. (2015). Detection of selection signatures on the X chromosome in three sheep breeds. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*,20360-20374. doi: 10.3390/ijms160920360.